

# アミノペプチダーゼ N の Cry8Da トキシンレセプターとしての

## 機能検証

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 山口 真

### 1. はじめに

マメコガネ (*Popillia japonica*) は、東アジアから北米大陸まで生息域を拡大し、農作物に重大な被害を与えている。*Bacillus thuringiensis galleriae* SDS-502 株が産生する Cry8Da トキシンは、マメコガネ幼虫と成虫に対し殺虫活性を持つことから、その殺虫活性機構の解明は、マメコガネ防除に大きく貢献する。Cry トキシンの殺虫活性機構解明には、Cry トキシンレセプターの特定および機能検証が必要である。これまでに Aminopeptidase N (PjAPN) がマメコガネ幼虫における Cry8Da トキシンレセプター候補分子として同定され (Yamaguchi *et al.* , 2013), PjAPN は Cry8Da トキシンと結合することが確認された。本研究では、*pjapn* 遺伝子を標的とした dsRNA を幼虫に注射することで *pjapn* 遺伝子をノックダウンし、Cry8Da トキシン結合能に差異が生じるのか調査した。

### 2. 方法

*pjapn* 遺伝子を標的とした dsRNA を幼虫の皮下に注射することで、中腸上皮細胞で発現する *pjapn* 遺伝子をノックダウンした。幼虫個体から中腸を摘出して cDNA を合成し、reverse transcription-定量 PCR (RT-qPCR) で、*pjapn* 遺伝子の発現量を調査した。供試した幼虫個体の中腸から調整した Brush border membrane vesicle (BBMV) を用いて、Cry8Da トキシンとの結合試験を行った。

### 3. 結果と考察

RT-qPCR により、dsRNA を注射した個体での *pjapn* 遺伝子のノックダウンが確認された。さらに、BBMV と Cry8Da トキシンとの結合実験を行ったところ、RNAi 処理個体が無処理個体よりも Cry8Da トキシンと BBMV との結合能が減少したことから、PjAPN と Cry8Da トキシンは中腸上皮細胞で結合することが示唆された。レセプターの機能は Cry トキシンとの結合だけでなく、Cry トキシンのオリゴマー化、中腸上皮細胞での小孔形成、細胞崩壊に関与している。本研究では、PjAPN の Cry8Da トキシンとの結合することは確認できたが、レセプターとしての他機能についてはさらに解析する必要があると考えられた。

### 4. まとめ

APN がマメコガネ幼虫における Cry8Da トキシンレセプターであるのかを検証するために *pjapn* 遺伝子のノックダウンを行い、無処理個体との BBMV と Cry8Da トキシンとの結合能を比較することでレセプターとしての機能を調査した。その結果、PjAPN が中腸上皮細胞で Cry8Da と結合することが分かった。